

011999549

WPI Acc No: 1998-416459/199836

Related WPI Acc No: 1998-416458; 1998-416493

XRAM Acc No: C98-125774

Targetting adenovirus to cell-surface protein - using bifunctional ligand that interacts with adenovirus fibre and cell-surface protein

Patent Assignee: CNRS CENT NAT RECH SCI (CNRS )

Inventor: BOULANGER P; HONG S S; KARAYAN L

Number of Countries: 023 Number of Patents: 006

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
FR 2758822	A1	19980731	FR 9711166	A	19970909	199836 B
WO 9833929	A2	19980806	WO 98FR184	A	19980130	199837
AU 9861046	A	19980825	AU 9861046	A	19980130	199903
EP 900280	A2	19990310	EP 98905474	A	19980130	199914
			WO 98FR184	A	19980130	
JP 2000510708	W	20000822	JP 98532596	A	19980130	200045
			WO 98FR184	A	19980130	
AU 731911	B	20010405	AU 9861046	A	19980130	200125

Priority Applications (No Type Date): FR 971005 A 19970130

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

FR 2758822 A1 43 C07K-014/705

WO 9833929 A2 F C12N-015/86

Designated States (National): AU CA JP SG US

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC  
NL PT SE

AU 9861046 A C12N-015/86 Based on patent WO 9833929

EP 900280 A2 F C12N-015/86 Based on patent WO 9833929

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE

JP 2000510708 W 64 C12N-015/09 Based on patent WO 9833929

AU 731911 B C12N-015/86 Previous Publ. patent AU 9861046

Based on patent WO 9833929

Abstract (Basic): FR 2758822 A

Targeting adenovirus to cell-surface protein other than the natural cellular receptor of the adenovirus using a bifunctional ligand, where the bifunctional ligand comprises a first portion capable of interacting with the fibre of the adenovirus, a second portion capable of interacting with the cell-surface protein, and optionally a spacer between the first and second portions.

USE - The ligand is used to target an adenovirus to a host cell of interest, e.g. a tumour cell, an infected cell, or a particular cell type bearing a specific surface marker.

Dwg.0/4

Title Terms: TARGET; ADENOVIRUS; CELL; SURFACE; PROTEIN; BIFUNCTIONAL; LIGAND; INTERACT; ADENOVIRUS; FIBRE; CELL; SURFACE; PROTEIN

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): C07K-014/705; C12N-015/09; C12N-015/86

International Patent Class (Additional): A61K-031/711; A61K-039/235;

A61K-048/00; C07K-009/00; C07K-014/075; C07K-014/74; C07K-014/78;

C12N-005/10; C12N-015/62; G01N-033/566; G01N-033/569

File Segment: CPI; EPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-F11; B04-N04B; B14-H01; D05-H11A

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M431 M782 M903 P633 Q233 V600 V611 V641 V901 V902 V917 V921

\*02\* D011 D601 G010 G013 G100 H1 H100 H181 H4 H401 H441 H481 H8 J0 J011

J012 J1 J171 J3 J371 K0 L2 L250 M280 M311 M312 M313 M314 M315 M321

M331 M332 M333 M340 M342 M343 M349 M371 M381 M391 M423 M431 M510

M511 M520 M530 M531 M540 M620 M782 M903 M904 P633 Q233 V901 V902

V914 V921 9836-05601-M

Generic Compound Numbers: 9836-05601-M

2000pt

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication : **2 758 822**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **97 11166**

(51) Int Cl<sup>6</sup> : C 07 K 14/705, C 07 K 14/075, C 12 N 5/10, A 61 K  
39/235

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 09.09.97.

(30) Priorité : 30.01.97 FR 09701005.

(71) Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS ETABLISSEMENT  
PUBLIC A CARACT SCIENT ET TECH — FR.

(43) Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 31.07.98 Bulletin 98/31.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : Ce dernier n'a pas été  
établi à la date de publication de la demande.

(60) Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

(72) Inventeur(s) : BOULANGER PIERRE, HONG SAW  
SEE et KARAYAN LUCIE.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : REGIMBEAU.

(54) UTILISATION D'UN POLYPEPTIDE A TITRE DE RECEPTEUR CELLULAIRE DES ADENOVIRUS.

(57) La présente invention a pour objet l'utilisation d'un polypeptide comprenant au moins 6 acides aminés continués de la séquence telle que montrée dans les identificateurs de séquence 1 à 5 à titres de récepteur et/ou co-récepteur des adénovirus. Elle concerne également l'utilisation d'une cellule capable d'exprimer un tel polypeptide ainsi que celle d'un ligand capable d'influencer l'attachement d'un adénovirus à une cellule hôte et/ou son entrée au sein de ladite cellule hôte. Enfin, elle a également trait à un récepteur cellulaire ainsi qu'à l'utilisation d'un ligand bifonctionnel pour cibler un adénovirus vers une cellule hôte portant à sa surface une protéine de surface autre que le récepteur cellulaire naturel dudit adénovirus. §

FR 2 758 822 - A1



La présente invention a pour objet l'utilisation de tout ou partie d'un antigène du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et/ou d'un module de type III de la fibronectine pour permettre ou faciliter l'attachement d'un adénovirus sur une cellule hôte et/ou son entrée au sein de celle-ci. L'invention vise également 5 l'utilisation d'un ligand capable de moduler l'infectivité d'un adénovirus vis à vis d'une cellule hôte, médiee par l'un ou l'autre des polypeptides cités ci-dessus. Enfin, l'invention concerne une méthode de biorpaillage pour identifier ou sélectionner un récepteur cellulaire d'un adénovirus ou un de ces ligands, notamment d'origine virale.

Les adénovirus sont des virus à ADN d'un large spectre d'hôte. Ils ont été 10 mis en évidence dans de nombreuses espèces animales et peuvent infecter divers types cellulaires. De nombreux sérotypes ont été caractérisés au sein de chaque espèce qui présentent une organisation génomique et un cycle infectieux comparables. D'une manière générale, le génome adénoviral est constitué d'une molécule d'ADN linéaire, bicaténaire et d'environ 36kb contenant les gènes codant 15 pour les protéines virales et à ses extrémités deux répétitions inversées (désignées ITR) intervenant dans la réplication et la région d'encapsidation.

Les adénovirus se répliquent dans les noyaux des cellules infectées. Le cycle infectieux se déroule en 2 étapes. La phase précoce précède l'initiation de la réplication et permet de produire les protéines précocees régulant la réplication et la 20 transcription de l'ADN viral. Ces étapes sont suivies de la phase tardive au cours de laquelle sont synthétisées les protéines structurales qui constituent les particules virales. L'assemblage des nouveaux virions prend place dans le noyau. Dans un premier temps, les protéines virales s'assemblent de manière à former des capsides vides de structure icosaédrique, dans lesquelles l'ADN adénoviral est encapsidé. Les 25 particules virales sont libérées et susceptibles d'infecter d'autres cellules permissives. A cet égard, la fibre et le penton base présents à la surface des capsides jouent un rôle critique dans l'attachement cellulaire des virions et leur internalisation.

L'adénovirus se lie à la surface des cellules permissives par l'intermédiaire de la fibre trimérique et d'un récepteur cellulaire jusqu'à présent, non identifié. Puis, la 30 particule est internalisée par endocytose par liaison du penton base aux intégrines cellulaires  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_5$  (Belin et Boulanger, 1993, J. Gen. Virol. 74, 1485-1497 ;

- 2 -

Mathias et al., 1994, *J. Virol.* 68, 6811-6814 ; Nemerow et al., 1994, *Trends Cell Biol.* 4, 52-55 ; Wickham et al., 1993, *Cell* 73, 309-319 ; Wickham et al., 1994, *J. Cell Biol.* 127, 257-264). La fibre d'Ad2 comporte 580 acides aminés (aa) dont la séquence est divulguée dans Herissé et al. (1981, *Nucleic Acid Res.* 9, 4023-4042).

5 Celle d'Ad 5 présente 582 acides aminés (Chroboczek et Jacrot, 1987, *Virology* 161, 549-554). Sa masse moléculaire est de 62 kDa, mais la fibre native se comporte comme une molécule de 160-180 kDa confirmant son assemblage sous forme d'un trimère.

La fibre est composée de 3 domaines (Chroboczek et al., 1995, *Current Top.*

10 *Microbiol. Immunol.* 199, 165-200) :

(1) En N-terminal, la "queue" très conservée d'un sérotype à l'autre, interagit avec le penton base et assure l'ancrage de la molécule dans la capsidé.

(2) La "tige" est une structure en bâtonnet de longueur variable selon les sérotypes. Par exemple, la tige de la fibre d'Ad5 contient 22 répétitions d'un 15 motif de 15 résidus qui pourraient adopter une conformation en feuillet  $\beta$ . Le nombre de ces répétitions diffère d'un sérotype à l'autre, ce qui explique les variations de longueur.

(3) Enfin, à l'extrémité distale de la tige, la "tête" ou sphérite terminale est une structure globulaire contenant les signaux de trimérisation (Hong et Engler, 1996, *J. Virol.* 70, 7071-7078 ; Novelli et Boulanger, 1991, *J. Biol. Chem.* 266, 9299-9303 ; Novelli et Boulanger, 1991, *Virology* 185, 365-376). La plupart des données expérimentales montrent que c'est le domaine de la tête qui est responsable de la liaison aux cellules permisives.

La complexité de l'attachement adénoviral laisse supposer qu'il serait sérotype 25 dépendant et que plusieurs protéines cellulaires pourraient y participer. En ce qui concerne l'Ad2, Hong et Boulanger (1995, *EMBO J.* 14, 4714-4727) ont identifié un certain nombre de motifs peptidiques trouvés dans plusieurs protéines cellulaires de surface susceptibles d'interagir avec les protéines capsidaires (penton base et fibre), en particulier les modules de type III 5 et 14 de la fibronectine humaine. Les 30 auteurs ont opéré par immobilisation sur un support inerte du penton base ou de la fibre (ligand) sur laquelle ils ont fait réagir une bibliothèque de phages exprimant des

hexapeptides aléatoires (désignés phagotopes). Les phages adsorbés, qui en théorie expriment des phagotopes interagissant avec un motif porté par la protéine adénovirale, sont ensuite élués soit classiquement à pH acide ou par compétition avec l'autre partenaire capsidaire non immobilisé (éluant). Cependant, le récepteur cellulaire des adénovirus et la région de la tête précisément impliquée dans la liaison au récepteur n'ont à ce jour pas encore été clairement identifiés.

On a maintenant procédé à une nouvelle technique de "biorpaillage" (pour biopanning en anglais) dans laquelle le ligand immobilisé est constitué par le domaine de la tête de la fibre d'Ad5 et l'éluant par un anticorps neutralisant dirigé contre cette dernière et isolé deux classes de phagotopes selon l'anticorps mis en oeuvre. La première correspond à une séquence conservée au sein du domaine  $\alpha$ -2 des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ( $\alpha$ -2 MHC-I) et la seconde à une séquence retrouvée dans les modules III de la fibronectine humaine (FNIII). Les données reportées dans les exemples qui suivent, soutiennent l'hypothèse que le  $\alpha$ -2 MHC-I constitue le récepteur primaire des adénovirus de sérotypes C et confirment la participation des FNIII à titre de co-récepteur ou co-facteur. On a également mis en évidence les régions de ces deux récepteurs et de la fibre interagissant l'une avec l'autre. En outre, on a généré un peptide antagoniste reproduisant le motif du domaine  $\alpha$ -2 MHC-I qui neutralise l'attachement des adénovirus et un peptide agoniste reproduisant les motifs FNIII qui stimule l'attachement.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet l'utilisation d'un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée :

- 25 (a) dans la SEQ ID NO: 1 commençant avec le résidu leucine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 25,
- (b) dans la SEQ ID NO: 2 commençant avec le résidu asparagine en position 1 et finissant avec le résidu asparagine en position 26,
- (c) dans la SEQ ID NO: 3 commençant avec le résidu valine en position 1 et finissant avec le résidu asparagine en position 25,
- 30 (d) dans la SEQ ID NO: 4 commençant avec le résidu sérine en position 1 et

finissant avec le résidu arginine en position 25, et/ou

(e) dans la SEQ ID NO: 5 commençant avec le résidu asparagine en position 1 et finissant avec le résidu sérine en position 25 ;  
pour permettre ou faciliter l'attachement d'un adénovirus à une cellule hôte et/ou

5 l'entrée dudit adénovirus au sein de ladite cellule hôte.

Aux termes de la présente invention, on entend par "polypeptide" toute molécule constituée par un enchaînement d'au moins 6 et, de préférence d'au moins 8, acides aminés. Le terme polypeptide comprend aussi bien des molécules peptidiques de courte longueur (de 6 à quelques dizaines de résidus) que des 10 molécules de longueur plus importante (jusqu'à plusieurs centaines de résidus), à la condition toutefois de permettre l'utilisation envisagée. On précise qu'un polypeptide en usage dans le cadre de la présente invention peut dériver d'un polypeptide natif tel que trouvé dans la nature, en particulier chez l'homme, ou d'une partie de celui-ci. Il peut également être chimère et comprendre des résidus supplémentaires d'une 15 origine quelconque fusionnés en N et/ou C-terminal et/ou insérés de manière à former un cadre de lecture ouvert. On peut également mettre en oeuvre un mutant obtenu par mutation, délétion, insertion et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés par rapport aux séquences divulguées dans les identificateurs de séquence (SEQ ID).

20 Un polypeptide préféré dans le cadre de la présente invention comprend en outre des éléments appropriés pour assurer son ancrage dans une membrane cellulaire ou sa présentation à la surface d'une cellule. De tels éléments sont connus de l'homme de l'art. A titre indicatif, on mentionne la présence d'un peptide signal généralement associé en position N-terminale et d'une région transmembranaire 25 présentant un degré d'hydrophobilité élevé. Mais on peut également avoir recours à d'autres techniques, par exemple chimiques, pour ancrer ou lier un polypeptide à une membrane ou une surface cellulaire.

Par "séquence d'acides aminés homologue", on entend une séquence présentant un degré d'homologie d'au moins 70 %, de manière avantageuse, d'au moins 80 %, 30 de manière préférée, d'au moins 90 % avec au moins 6 acides aminés continus d'une des séquences citées. Le terme identique fait référence à 100 % d'homologie.

L'homme du métier connaît les règles générales qui permettent de calculer le degré d'homologie entre deux séquences. On procède généralement par alignement des séquences éventuellement à l'aide de programmes d'ordinateur spécialisés. Il peut être nécessaire d'introduire artificiellement des emplacements vacants. Une fois que

5 l'alignement optimal est réalisé, le degré d'homologie est établi en comptabilisant toutes les positions dans lesquelles les acides aminés des deux séquences se retrouvent à l'identique, par rapport au nombre total de positions.

Par "attachement d'un adénovirus à une cellule hôte", on entend la liaison de la particule virale à la cellule. Par "entrée d'un adénovirus au sein d'une cellule hôte",

10 on désigne la pénétration du virus à l'intérieur de la cellule hôte. L'attachement et/ou l'entrée sont de préférence médié(s) au moins en partie par le(s) polypeptide(s) en usage dans le cadre de la présente invention par interaction avec la capsidé adénovirale. Bien entendu, d'autres molécules polypeptidiques ou non peuvent également participer à ces processus reconnus dans le domaine de l'art comme

15 complexes et multifactoriels. Ils peuvent être évalués par toute technique de l'art, telles que celles décrites ci-après mettant en oeuvre une lignée cellulaire permissive et des particules marquées radioactivement ou exprimant un gène reporter par exemple le gène de la luciférase. A 0°C, seul l'attachement peut avoir lieu, la pénétration virale nécessitant une température de 37°C.

20 Aux fins de la présente invention, un adénovirus peut être d'origine humaine ou animale (canine, aviaire, bovine...) ou hybride comprenant des fragments de génome. Ces virus et leur génome sont décrits dans la littérature (voir par exemple Graham et Prevec, Methods in Molecular Biology, Vol 7 ; Gene Transfer and Expression Protocols, Ed : E.J. Murray, 1991, The Human Press Inc., Clinton, NJ).

25 On préfère mettre en oeuvre un adénovirus recombinant défectif pour la réplication et exprimant notamment un gène d'intérêt thérapeutique. Avantageusement, le génome adénoviral est modifié par déletion ou mutation de séquences essentielles à la réplication et, en particulier, comprises dans les régions E1, E2, E4 et/ou L1-L5 (voir par exemple la demande internationale WO 94/28152).

30 Selon une première variante, la présente invention a pour objet l'utilisation d'un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés homologue ou identique à

au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 1 commençant avec le résidu leucine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 25.

De manière avantageuse, un polypeptide en usage dans le cadre de la présente invention comprend une séquence en acide aminé homologue ou identique à tout ou partie d'un antigène du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC-I) et, de préférence, de la chaîne lourde de ce dernier.

Toutes les cellules d'un organisme présentent sur leur membrane des molécules appelées antigènes d'histocompatibilité qui définissent chaque individu. Les gènes correspondants, plus d'une dizaine, sont localisés sur le chromosome 6 chez l'homme et présentent un polymorphisme important, ce qui permet d'assurer une grande variabilité de ces marqueurs d'identité. Il existe deux catégories différentes de ces antigènes d'histocompatibilité, respectivement de classe I et II, dont la structure et les fonctions sont distinctes. Les molécules de classe I, appelées HLA (pour Human Leukocyte Antigen en anglais) interviennent pour présenter les peptides antigéniques à la surface cellulaire et jouent un rôle essentiel dans les réponses immunitaires antivirales exercées par les lymphocytes T cytotoxiques.

Les molécules MHC-I sont des hétérodimères composés d'une chaîne légère non MHC désignée  $\beta$ 2-microglobuline ( $\beta$ 2m) et d'une chaîne lourde codée par les gènes MHC, liées de manière non covalente. La chaîne lourde est une protéine membranaire dont la partie N-terminale est orientée à l'extérieur de la cellule alors que la portion C-terminale est cytoplasmique. La première comprend 3 domaines désignés  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 et  $\alpha$ 3 d'environ 90 acides aminés chacun. Elle est suivie d'une région transmembranaire d'environ 25 acides aminés puis de la région C-terminale d'une trentaine d'acides aminés. La plupart des variations entre les produits des différents allèles sont localisées dans les domaines  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2, le domaine  $\alpha$ 3 étant relativement conservé et la  $\beta$ 2m invariable (pour une revue et la comparaison de séquence entre les membres des MHC-I, voir Bjorkman et Parham, 1990, Annu. Rev. Biochem. 59, 253-288).

Parmi les polypeptides convenant aux fins de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les antigènes HLA A, B, C, D, E et F ou des polypeptides

en dérivant.

D'une manière particulièrement avantageuse, le polypeptide en usage dans le cadre de la présente invention comprend une séquence homologue ou identique à tout ou partie de la région C-terminale du domaine  $\alpha 2$  de la chaîne lourde des MHC-

5 I et, plus particulièrement, à la partie centrée sur le résidu tryptophane en position 167, notamment celle s'étendant des résidus 156 à 180 (SEQ ID NO: 1). La numérotation à laquelle il est fait référence est conforme à celle utilisée par exemple dans Bjorkman et Parham (1990, *supra*).

Selon une autre variante, un polypeptide en usage dans le cadre de la présente 10 invention comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée :

- dans la SEQ ID NO: 2 commençant avec le résidu asparagine en position 1 et finissant avec le résidu asparagine en position 26,
- dans la SEQ ID NO: 3 commençant avec le résidu valine en position 1 et 15 finissant avec le résidu asparagine en position 25,
- dans la SEQ ID NO: 4 commençant avec le résidu sérine en position 1 et finissant avec le résidu arginine en position 25, et/ou
- dans la SEQ ID NO: 5 commençant avec le résidu asparagine en position 1 et finissant avec le résidu sérine en position 25.

20 Un polypeptide préféré comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à la fibronectine et, en particulier, à l'un au moins de ses modules de type III et, notamment, aux modules FNIII 1, 4, 5 et/ou 14. Bien entendu, il peut en comprendre plusieurs. On peut également envisager l'utilisation de la fibronectine humaine ou d'un peptide en dérivant, par exemple par mutation ou fragmentation.

25 A titre d'information, la fibronectine codée par un gène unique est une molécule intervenant dans les phénomènes d'adhésion et de contact cellulaire. Sa séquence et ses caractéristiques sont décrites dans la littérature accessible à l'homme du métier (voir en particulier Bork et Doolittle, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 8990- 8994 et Dickinson et al., 1994, 236, 1079-1092). Elle est composée de 14 modules

30 dits de type III (numérotés de 1 à 14) dont la séquence primaire peut varier mais dont la conformation en feuillet  $\beta$  est conservée.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, un polypeptide tel que défini ci-dessus est plus particulièrement destiné à permettre ou faciliter l'attachement d'un adénovirus de sérotype C à une cellule hôte et/ou son entrée dans cette dernière. Parmi les adénovirus envisageables, on peut citer plus 5 particulièrement les sérotypes 2 et 5.

La présente invention concerne également une cellule hôte capable d'exprimer un polypeptide en usage dans le cadre de la présente invention et son utilisation pour permettre ou faciliter l'attachement d'un adénovirus à sa surface et/ou l'entrée dudit adénovirus. Divers types de cellules hôtes peuvent être considérés. Il peut s'agir de 10 cellules d'une origine quelconque, par exemple de microorganismes, levures, insectes, plantes, animales. On préférera notamment une cellule de mammifère et, en particulier, une cellule humaine de type primaire, tumorale ou issue d'une lignée cultivable *in vitro*. Elle peut avoir une origine hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte, macrophage...), hépatique, rénale, du 15 système nerveux central, fibroblaste, épithéliale, pulmonaire ou musculaire (myocyte, myoblaste, cellule satellite, cardiomyocyte...). Une cellule particulièrement préférée est ou dérive de la lignée 293 établie à partir de cellules de rein embryonnaire par intégration de la région adénovirale E1 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72). On indique que l'expression d'un ou plusieurs polypeptides en usage dans le 20 cadre de la présente invention à la surface d'une cellule hôte n'exprimant pas habituellement les MHC-I et/ou la fibronectine devrait permettre son infectivité par un adénovirus. Elle pourrait être utilisée comme nouvelle cellule productrice de vecteurs adénoviraux. On peut également envisager le cas d'une surexpression dans une cellule exprimant naturellement ledit polypeptide. Une lignée de surexpression 25 dérivant de la lignée 293 devrait permettre d'améliorer les rendements de production d'un adénovirus d'intérêt. Bien entendu, le polypeptide en usage dans le cadre de la présente invention peut être associé à la cellule par des moyens chimiques ou par l'intermédiaire d'un ligand reconnaissant une protéine de surface cellulaire. Mais, on peut également envisager une expression par les techniques de l'ADN recombinant. 30 Un tel mode de réalisation est à la portée de l'homme de l'art. A titre indicatif, la séquence nucléotidique codant pour le polypeptide en question peut être isolée (par

les techniques standards de PCR ou clonage) ou synthétisée chimiquement avant d'être insérée dans un vecteur d'expression conventionnel sous le contrôle d'éléments de régulation appropriés, le vecteur étant introduit dans la cellule hôte par toute technique de l'art. La cellule hôte en usage dans le cadre de la présente invention 5 peut également être modifiée de manière à complémenter un adénovirus défectif par transfection de fragment(s) approprié(s) de génome adénoviral.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un ligand capable d'influencer l'attachement d'un adénovirus à une cellule hôte et/ou son entrée au sein de cette dernière médiés par un polypeptide tel que défini ci-dessus. Le ligand en 10 usage dans l'invention peut être de nature quelconque. On peut citer par exemple les peptides, les hormones, les anticorps ou leurs dérivés et, notamment, les anticorps simple chaîne de type scFv (pour single chain fragment variable en anglais) et les récepteurs solubles dépourvus de leur région transmembranaire. En particulier, un tel ligand peut dériver d'un polypeptide en usage dans la présente invention. 15 Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, le ligand peut avoir une influence négative (antagoniste) ou positive (agoniste). De préférence, un ligand préféré présente une constante de dissociation à l'égard de l'adénovirus comprise entre 0,01 et 100 nM, avantageusement entre 0,1 et 50 nM et, de manière tout à fait préférée, entre 0,5 et 10 nM.

20 Dans le cas d'un antagoniste, l'interaction du ligand avec la fibre permettra de diminuer ou inhiber les processus d'attachement et/ou d'entrée d'un adénovirus. Dans ce contexte, un ligand particulièrement préféré est basé sur un polypeptide tel que défini dans la SEQ ID NO: 1. A titre d'exemple, on peut citer un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 25 acides aminés continus compris dans la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 6 commençant avec le résidu arginine en position 1 et finissant avec le résidu arginine en position 20. On préférera avoir recours au peptide désigné MH20 dans les exemples qui suivent.

Dans le cas d'une influence positive, le ligand en usage dans le cadre de la 30 présente invention est utilisé pour permettre ou stimuler l'attachement et/ou l'entrée des adénovirus. Un ligand convenant aux fins de l'invention comprend une séquence

en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 7 commençant avec le résidu arginine en position 1 et finissant avec le résidu sérine en position 20. Un exemple préféré consiste en le peptide désigné ci-après FN20.

5 La présente invention a également trait à un ligand comprenant une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 6 ou 7.

Mais, il peut également s'agir d'un ligand d'origine adénovirale. Selon ce mode de réalisation, un ligand préféré dérive de la fibre d'un adénovirus, en particulier, de 10 la partie de la tête interagissant avec les polypeptides précités. Un motif peptidique choisi dans cette région devrait donc influencer l'infectivité des adénovirus à l'égard d'une cellule hôte exprimant le polypeptide. Avantageusement, on a recours à un ligand recouvrant les résidus 438 à 486 de la fibre d'un adénovirus. Plus particulièrement, un ligand d'un polypeptide tel que défini par la SEQ ID NO: 1 15 dérive de préférence d'un Ad5 et comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus de la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 8, débutant à l'acide aminé leucine en position 1 et se terminant à l'acide aminé acide aspartique en position 18. Un ligand également envisageable peut dériver de la fibre d'un adénovirus de sérotype 2 et comprendre 20 une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés de la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 9 débutant au résidu thréonine en position 1 et se terminant au résidu valine en position 16.

Le ligand d'un polypeptide tel que défini par les SEQ ID NO: 2 à 5 est plus particulièrement caractérisé par une séquence en acides aminés homologue ou 25 identique à au moins 6 acides aminés de la séquence telle que montrée dans la SEQ ID NO: 10 débutant au résidu leucine en position 1 et se terminant au résidu thréonine en position 14 (Ad5) ou dans la SEQ ID NO: 11 débutant au résidu asparagine en position 1 et se terminant au résidu asparagine en position 13 (Ad2).

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un ligand selon 30 l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné à inhiber ou diminuer une infection par un adénovirus. Dans ce contexte, on préférera l'usage d'un ligand

antagoniste dans un but thérapeutique ou prophylactique. L'utilisation d'un ligand selon l'invention, de préférence agoniste, convient à la préparation d'un médicament destiné à favoriser ou faciliter une infection par un adénovirus, et, en particulier, d'un adénovirus recombinant porteur d'un gène thérapeutique à visée de thérapie génique 5 (curative) ou anti-virale (SIDA) ou anti-cancéreuse. Un tel médicament trouve son utilité par exemple en association avec les traitements de thérapie génique afin d'améliorer l'infection virale chez un patient traité par un adénovirus recombinant. On peut envisager une voie d'administration parentérale, orale ou encore par aérosol. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois 10 après un certain délai d'intervalle. Le dosage et la formulation appropriés varient en fonction de différents paramètres, par exemple de l'individu, de la maladie à traiter, de l'effet désiré, de la voie d'administration ou encore de l'adénovirus en cause.

La présente invention concerne également une méthode pour sélectionner ou identifier un récepteur cellulaire d'un virus dans un échantillon approprié, 15 comprenant :

- (a) l'immobilisation sur un support inerte d'un réactif d'origine virale comprenant tout ou partie d'une protéine de surface dudit virus déterminant son attachement au récepteur cellulaire,
- (b) l'incubation pendant un temps déterminé avec l'échantillon,
- 20 (c) l'élution de l'échantillon retenu à l'étape (b) avec tout ou partie d'un anticorps dirigé contre ledit réactif d'origine virale, et
- (d) l'analyse de l'échantillon élué à l'étape (c).

Le support inerte peut être sans limitation sous une forme quelconque (cône, tube, puits, billes ou analogues) et d'un matériau quelconque (naturel, de synthèse 25 tels que les polymères, modifié chimiquement ou non...). La fixation du réactif sur le support inerte peut être réalisée de manière directe ou indirecte. De manière directe, on procédera de préférence par adsorption c'est à dire de manière non covalente bien que l'établissement de liaisons covalentes puisse également être considéré. De manière indirecte, on peut fixer préalablement un composé anti-réactif 30 capable d'interagir avec le réactif de façon à immobiliser l'ensemble sur le support inerte. Selon un mode de réalisation avantageux, l'échantillon est constitué par une

bibliothèque dite aléatoire et, en particulier d'expression (fragments génomiques, cADN) ou peptidique ou, de manière préférée, de phages exprimant des motifs peptidiques (phagotopes). De telles bibliothèques sont décrites dans la littérature ou accessibles commercialement. Dans le but de sélectionner ou identifier un récepteur 5 cellulaire d'un adénovirus, on met de préférence en oeuvre à titre de réactif d'origine virale, tout ou partie de la fibre et, notamment, de la tête d'un adénovirus et, à titre d'éluant, un anticorps anti-fibre neutralisant (inhibiteur de l'attachement du virus à la surface de la cellule hôte). La fibre ou ses fragments peuvent être produits par voie recombinante et les anticorps par la technique d'hybridome ou par génie 10 génétique (production d'anticorps simple chaîne scFv, Fab...). On indique que la plupart des anticorps anti-fibre sont neutralisants. L'analyse est réalisée par comparaison de la séquence de l'échantillon élué avec les banques de données. Une telle analyse est à la portée de l'homme de l'art.

Enfin, la présente invention vise également une méthode pour sélectionner ou 15 identifier la partie d'une protéine virale déterminant l'attachement d'un virus à un récepteur cellulaire dans un échantillon approprié, comprenant :

- (a) l'immobilisation sur un support inerte de tout ou partie d'un anticorps dirigé contre ladite protéine virale,
- (b) l'incubation pendant un temps déterminé avec ledit échantillon,
- 20 (c) l'élution de l'échantillon retenu à l'étape (b) avec un réactif d'origine virale comprenant tout ou partie de ladite protéine virale, et
- (d) l'analyse de l'échantillon élué à l'étape (c).

Les modes de réalisation spécifiques cités précédemment peuvent également s'appliquer dans ce contexte.

25 La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un ligand bifonctionnel pour le ciblage d'un adénovirus vers une protéine de surface cellulaire autre que le récepteur cellulaire naturel dudit adénovirus, ledit ligand bifonctionnel comportant une première partie ligand capable d'interagir avec la fibre dudit adénovirus, une deuxième partie ligand capable d'interagir avec ladite protéine de 30 surface cellulaire et, éventuellement, un espaceur entre lesdites première et deuxième parties ligand.

Au sens de la présente invention, un ligand bifonctionnel est capable d'interagir avec deux entités différentes l'une de préférence située à la surface d'un adénovirus et l'autre à la surface d'une cellule hôte, au niveau d'une protéine de surface cellulaire autre que le récepteur cellulaire naturel dudit adénovirus. Par ailleurs, les deux parties ligands peuvent être éventuellement séparées par un espaceur comprenant de 1 à une quinzaine d'acides aminés, de préférences non chargés. L'utilisation d'un tel ligand bifonctionnel permet de cibler un adénovirus vers une cellule hôte d'intérêt, par exemple une cellule tumorale, une cellule infectée, un type cellulaire particulier ou une catégorie de cellules portant un marqueur de surface spécifique.

5 De préférence, la partie ligand interagissant avec la fibre adénovirale comprend une séquence en acides aminés homogogue ou identique à au moins 6 acides aminés continus compris dans la SEQ. ID No: 6. De manière encore plus préférée, elle est constituée par le peptide MH20 (SEQ ID No: 6).

10 Pour ce qui est de la partie ligand interagissant avec la protéine de surface cellulaire, celle-ci est adaptée à la cellule hôte que l'on désire cibler. S'agissant d'une cellule infectée par le virus HIV (Human Immunodeficiency Virus), le ligand peut être un fragment d'anticorps contre la fusine, le récepteur CD4 ou contre une protéine virale exposée (glycoprotéine d'enveloppe) ou encore la partie de la protéine TAT du virus HIV s'étendant des résidus 37 à 72 ; (Fawell et al. 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 664-668). S'agissant d'une cellule tumorale, le choix se portera sur un ligand reconnaissant un antigène spécifique de tumeur (MUC-1 dans le cas du cancer du sein, antigènes du papilloma virus HPV ... etc) ou surexprimé (récepteur à l'IL-2 surexprimé dans certaines tumeurs lymphoïdes). Si l'on désire cibler les lymphocytes T, on peut employer un ligand du récepteur de 15 cellule T. Par ailleurs, la transferrine est un bon candidat pour un ciblage hépatique. On peut également citer le peptide EGF (abréviation de Epidermal Growth Factor) permettant le ciblage vers les cellules exprimant le récepteur à l'EGF ou le peptide GRP (pour Gastrin Releasing Peptide) de séquence GNHWAVGHLM (Michael et al., 1995, Gene Ther. 2, 660-668) se liant au récepteur cellulaire GRP. D'une manière générale, les ligands qui peuvent être utilisés dans le contexte de l'invention sont largement décrits dans la littérature.

20

25

30

Un ligand bifonctionnel en usage dans le cadre de la présente invention peut être obtenu par les techniques de l'ADN recombinant, par synthèse ou par couplage chimique des deux parties ligands en question. De préférence, l'adénovirus à cibler est recombinant et porte un gène cytotoxique ou capable d'induire l'apoptose 5 cellulaire. De tels gènes sont parfaitement connus. On peut citer en particulier le gène codant pour la thymidine kinase du virus HSV-1 (Virus de l'herpès simplex de type 1).

La présente invention est illustrée par référence aux figures suivantes :

La Figure 1 présente les phagotopes obtenus après biorpaillage utilisant 10 l'anticorps 1D6.3 (a) ou 7A2.7 (b) à titre de ligand. Les motifs peptidiques des phagotopes sont alignés par rapport à la séquence de la tête d'Ad5 (le résidu méthionine initiateur de la fibre représentant le +1). Les régions formant des structures feuillets $\beta$  (Xia et al., 1994, *supra*) sont soulignées et indiquées par (D), (E) et (F). Les résidus identiques ou conservés dans les séquences sont indiqués en 15 gras.

La Figure 2 présente les phagotopes obtenus après biorpaillage utilisant (a) l'anticorps 7A2.7 ou (c) 1D6.3 à titre d'éluant, (b) et (d) les séquences consensus déterminées à partir des phagotopes (a) et (c) respectivement ainsi que les séquences 20 homologues trouvées par analyse de la banque de données SWISS PROT. Les résidus conservés à des positions analogues sont indiqués en gras.

La Figure 3 illustre l'expression du gène luciférase dans les cellules HeLa infectées avec le virus Ad5Luc3 à une MOI constante (0,16 ffu/10<sup>5</sup> cellules). (○) l'Ad5Luc3 est ajouté aux cellules refroidies à 0°C en présence de molarités croissantes de peptide (a) FN20 (0 à 500  $\mu$ M) ou (b) MH20 (0 à 50  $\mu$ M). Les 25 témoins correspondent à l'incubation des peptides après l'attachement de l'Ad5Luc3 (△) ou après l'endocytose (□).

La Figure 4 illustre l'expression du gène luciférase dans les cellules Daudi-HLA- (○) ou Daudi-HLA+ (○) infectées avec des concentrations croissantes 30 d'Ad5Luc3 (0,3 à 150 ffu/10<sup>5</sup> cellules). L'Ad5Luc3 est mis en contact des cellules pré-refroidies à 0°C pendant 1 h afin de permettre l'attachement viral mais pas l'entrée. L'activité luciférase est évaluée après 18 h de culture à 37°C. Les valeurs

- 15 -

RLU représentent la moyenne de trois expériences séparées.

### EXEMPLES

Les cellules HeLa (ATCC CCL2) sont cultivées en monocouches selon les 5 techniques de l'art. On utilise de préférence un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; Gibco) contenant 10 % de sérum de veau foetal (FCS) inactivé à la chaleur, de la L-glutamine et des antibiotiques habituels. Les cellules Daudi HLA- (ATCC CCL213) et HLA+ (Quillet et al., 1988, J. Immunol. 141, 17-20) sont maintenues dans du milieu RPMI 1640 (Gibco) supplémenté avec 15 % de 10 FCS.

L'Ad5 sauvage et l'Ad5Luc3 recombinant sont propagés dans les cellules HeLa par les techniques standards. A titre indicatif, Ad5Luc3 est un adénovirus compétent pour la réplication qui contient le gène luciférase placé sous le contrôle du promoteur précoce du virus SV40 (Virus simien 40) inséré dans la région E3 15 du génome adénoviral (Mittal et al., 1993, Virus Research 28, 67-90).

EXEMPLE 1 : Production d'anticorps monoclonaux (mAb) capable d'inhiber l'attachement de l'Ad5 aux cellules permissives.

20 Les mAbs murins 1D6.3 et 7A2.7 ont été générés par les techniques classiques en injectant la tête de la fibre d'Ad5 produite dans les bactéries par voie recombinante (Henry et al., 1994, J. Virol. 68, 5239-5246) à des souris Balb/C. La fusion et l'obtention de clones d'hybridomes sont des techniques conventionnelles à la portée de l'homme de l'art. Les clones sécrétant sont sélectionnés par leur 25 reconnaissance de l'antigène qui a servi à l'immunisation en ELISA. On indique qu'ils présentent une activité neutralisante à l'égard des virions (Michael et al., en préparation).

*Séro-réactivité des anticorps monoclonaux 1D6.3 et 7A2.7.*

30 La réactivité des anticorps est testée à l'égard du domaine de la tête de la fibre de 3 sérotypes différents (Ad2, Ad5 et Ad3) préparé par voie recombinante. Les

- 16 -

séquences correspondantes sont isolées par PCR (Polymérase Chain Reaction) à partir d'ADN génomique viral puis introduites dans le virus AcNPV (*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus) sous le contrôle du promoteur polyhedrine (Luckow et Summer, 1989, *Virology* 170, 31-39). Les protéines recombinantes 5 sont exprimées dans les cellules d'insecte Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). La technologie générale est détaillée dans Karayan et al. (1994, *Virology* 202, 782-796) et Novelli et Boulanger (1991, *Virology* 185, 365-376). Plus précisément, les séquences Ad5 portant le dernier motif répété de la tige suivi de la tête de la fibre, 10 sont clonées à l'aide des amorces représentées aux SEQ ID NO: 12 et 13. L'amorce sens correspond aux nucléotides 32164 à 32205 du génome Ad5 (Chroboczek et Jacrot, 1987, *Virology* 161, 549-554), inclut 4 mismatch de manière à créer un site *Bam*HII et à remplacer la thréonine en position 388 de la fibre native par un codon ATG initiateur. L'amorce antisens correspond aux nucléotides 32919 à 32883 du 15 génome Ad5 et permet de créer un site *Kpn*I pour faciliter les étapes ultérieures de clonage. La protéine recombinante récoltée dans les surnageants de cellules Sf9 est désignée F5-AT386. La tête de l'Ad2 est produite à partir du vecteur baculovirus décrit dans Louis et al. (1994, *J. Virol.* 68, 4104-4106). Le produit d'expression 20 désigné F2-AT388 débute en position 388 (par remplacement de l'Ala de la séquence native par une Met) et porte, outre le domaine de la tête, le dernier motif répété de la tige. Enfin, pour les séquences correspondantes de l'Ad3, on utilise une amorce sens (SEQ ID NO: 14) conçue pour introduire un site de clonage *Nco*I et remplacer les codons Asn et Ser en position 124 et 125 par des codons Met et Ala respectivement. L'amorce antisens (SEQ ID NO: 15) introduit un site *Kpn*I. Le 25 produit d'expression est désigné F3-AT124.

Les cupules d'une plaque ELISA sont recouvertes par la protéine recombinante F5-AT386, F2-AT388 ou F3-AT124 sur laquelle on fait réagir le mAb 1D6.3 ou 7A2.7 puis un anticorps anti-souris marqué (par exemple à la phosphatase ou la peroxydase). Une réaction positive est observée à l'égard de la protéine recombinante F5-AT386 native. Aucune réaction n'est détectée dans les 30 puits contenant la protéine F5-AT386 dénaturée au SDS ni ceux contenant les produits F2-AT388 et F3-AT124 natifs ou dénaturés. Ces données suggèrent que

ces anticorps reconnaissent un épitope conformationnel spécifique du sérotype C.

*Effet inhibiteur des anticorps monoclonaux 1d6.3 et 7A2.7 sur l'attachement cellulaire de l'Ad5.*

5       On procède à un test de microliaison sur cellules HeLa en culture à l'aide de virions Ad5 marqués à la valine [ $^{14}\text{C}$ ] (activité spécifique de 2200 à 2500 cpm/  $10^8$  virions) suivi d'une autoradiographie *in situ* (Silver et Anderson, 1988, *Virology* *165*, 377-387). Pour ce faire, les cellules à l'état de semi confluence sont mises en présence d'une quantité constante de virions radioactifs ( $10^3$  cpm pour  $5 \times 10^4$  cellules) à une multiplicité d'infection (MOI) de 1000 virions par cellule pendant 1 h à  $0^\circ\text{C}$  en présence de mAb 1D6.3 ou 7A2.7 (dilutions au 1:10, 1:8, 1:4 et 1:2 des surnageants d'hybridomes respectifs dont la concentration en mAb est estimée à 0,1-0,2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ce qui correspond à un excès en mAb par rapport aux virions présents dans l'innoculum de 100, 250, 500 et 1000 respectivement). Les cellules 10 sont ensuite lavées en présence de PBS, fixées par 0,1 % de paraformaldéhyde dans du PBS, séchées et recouvertes par l'émulsion K4 sous forme de gel (Ilford Nuclear Research). Après une exposition d'une semaine et développement (agent de développement D19B, Kodak), les échantillons sont colorés brièvement par 0,5 % de bleu de toluidine repris dans  $\text{H}_2\text{O}$  et examinés sous microscope. La densité des 15 grains d'argent réduit autour du contour des cellules est représentatif du nombre de virions [ $^{14}\text{C}$ ] liés à la surface cellulaire.

20      En l'absence de mAb anti-tête ou à une concentration faible (dilution 1:10), un halo sombre de grains d'argent réduit est visible autour des cellules indiquant une adsorption des virions à leur surface. Une réduction du halo dépendante de la 25 concentration en mAb est observée pour les dilutions 1:8, 1:4 et 1:2. Ces résultats traduisent un blocage de la liaison de la tête adénovirale au récepteur cellulaire primaire dû aux mAb 1D6.3 et 7A2.7 dirigés contre cette partie de la fibre. Une comparaison de la surface des halos pour les mêmes dilutions montre que l'anticorps 1D6.3 est plus inhibiteur de l'attachement de l'Ad5 au récepteur 30 cellulaire des HeLa que le mAb 7A2.7.

- 18 -

EXAMPLE 2 : Identification des épitopes des mAb 1D6.3 et 7A2.7

Les épitopes de la fibre étant présumés être conformationnels (Fender et al., 1995, *Virology* 214, 110-117), la méthode classique d'identification des épitopes par balayage de peptides n'est pas appropriée. On procède selon une technique de biorpaillage dérivée de celles décrites par Smith et Scott (1993, *Methods Enzymol.* 217, 228-257) et Hong et Boulanger (1995, *EMBO J.* 14, 4714-4727). Dans ce cas, le mAb 1D6.3 ou 7A2.7 est adsorbé une nuit à 4°C sur une plaque de microtitration (Nunc Immunomodule MaxiSorp F8) à une concentration de 5 1 µg/puits dans un tampon carbonate de sodium 0,1 M pH9,6. Les anticorps immobilisés sont mis en contact d'une bibliothèque de phages exprimant des hexapeptides (phages fUSE5 ; Scott et Smith, 1990, *Science* 249, 386-390). Dans une seconde étape les phages retenus sont élués soit par un tampon d'élution acide conventionnel soit, plus sélectivement, par compétition en présence d'un excès de 10 protéine recombinante F5-AT386. Les motifs hexapeptidiques (phagotopes) portés par les phages élués sont déterminés par séquençage de la protéine pIII fUSE5 par la méthode de Sanger et al. (1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467). Les homologies de séquences avec les phagotopes sont recherchées dans la banque 15 de données Swiss Prot et le programme FASTA 1.6 (Pearson et Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444-2448) et les alignements de séquences réalisées en utilisant la version W(1;4) du programme Clustal (Higgins et Sharp, 20 1988, *Gene* 73, 237-244).

Comme le montre la Figure 1, le mAb 1D6.3 retient différents phagotopes dont les séquences se chevauchent, et sont homologues à la tête d'Ad5 s'étendant 25 entre les résidus Val en position 438 et Asp en position 462. En dépit d'un certain degré de dégénération et de dispersion, on a pu déterminer un motif central de séquence LAPISGTVQSAHLIIRFD correspondant aux acides aminés en positions 445 à 462 (SEQ ID NO: 8). Ce motif est centré sur le résidu His en position 456, ce qui corrobore la présence d'histidine dans plusieurs phagotopes indépendants. 30 De plus, trois phagotopes contiennent une histidine proche d'une sérine (GISHTG et GASHTV) et une séquence homologue est trouvée dans la tête (<sup>453</sup>QSAHLI<sup>458</sup>).

Du côté N-terminal, la séquence LAPIS est représentée dans plusieurs phagotopes sous la forme L-P, VAP-S et LIPFNS.

Les analyses de séquence des 15 phagotopes retenus par le mAb 7A2.7, ont mises en évidence la présence d'une proline à 4 reprises, de tryptophane et histidine 5 8 fois et l'association dans le même phagotope de deux résidus aromatiques est trouvée 5 fois. Il semble donc que l'épitope du mAb 7A2.7 contienne un résidu proline, tel que celui en position 475 de la fibre, à proximité d'un groupe de résidus aromatiques, tel que <sup>477</sup>YWNF<sup>480</sup>. En outre, deux phagotopes FWLAVR et WALFRS sont homologues au motif <sup>477</sup>YWNFR<sup>481</sup>. Sur la base de ces données, 10 l'épitope du mAb 7A2.7 a été cartographié entre les résidus 473 et 486 de la fibre Ad5 (SEQ ID NO: 10).

En résumé, les mAb 1D6.3 et 7A2.7 reconnaissent des segments adjacents de 15 à 20 aa dans la séquence linéaire de la tête d'Ad5, les résidus s'étendant des positions 445 à 462 et 473 à 486 respectivement. Selon le modèle tridimensionnel 15 de la tête proposé par Xia et al. (1994, Curr. Biol. Structure 2, 1259-1270), les deux épitopes occupent des régions continues d'un point de vue spatial. L'épitope du mAb 1D6.3 recouvre une partie de la boucle CD et du feuillet  $\beta$  D, alors que l'épitope du mAb 7A2.7 est localisé au niveau du segment adjacent DE et des deux feuilllets  $\beta$  E et F. L'épitope 1D6.3 se situe à l'intérieur d'un feuillet R alors que 20 l'épitope 7A2.7 est orienté plus latéralement par rapport au feuillet R.

EXEMPLE 3 : Identification des récepteurs cellulaires de l'Ad5 par la technique de biorpaillage réverse.

25 Cette technique est dite réverse par rapport à la précédente puisqu'on utilise la fibre comme ligand et le mAb comme éluant. On procède donc par immobilisation de la tête de la fibre de l'Ad5 sur laquelle on fait réagir la bibliothèque de phages exprimant des phagotopes hexapeptidiques. Les phages adsorbés peuvent être élués soit par un tampon acide conventionnel soit par le mAb 30 1D6.3 ou 7A2.7 et la protéine pIII recombinante portant leurs phagotopes respectifs est séquencée. La recherche dans les banques de données est effectuée

comme ci-dessus. Les motifs hexapeptidiques identifiés sont présentés à la Figure 2.

Les phagotopes produits par compétition avec le mAb 7A2.7 sont présentés à la Figure 2a. Leur analyse permet de dériver une séquence consensus (Figure 2b) qui présente une homologie avec les motifs 1, 3, 5 et 14 du module de type III de la fibronectine humaine (SEQ ID NO: 2 à 5) (Main et al., 1992, Cell 71, 671-678). Ces derniers se situent au niveau du feuillet  $\beta$  B et de la boucle adjacente BC du module FNIII (Dickinson et al., 1994, J. Mol. Biol. 236, 1079-1092).

Les phagotopes élués après action du mAb 1D6.3 sont décrits à la Figure 2c. L'ensemble des séquences se chevauchent et permettent de déterminer également une séquence consensus (Figure 2d). La recherche d'homologie avec les séquences répertoriées dans les banques de données révèle une homologie avec la région C-terminale du domaine  $\alpha$ -2 de la chaîne lourde des molécules MHC de classe I (MHC-I $\alpha$ -2) (position 156 à 180) (SEQ ID NO: 1).

**EXEMPLE 4 : Interactions de la fibre adénovirale avec le module FNIII et le domaine MHC-I $\alpha$ -2**

L'interaction est étudiée *in vitro* à l'aide d'une protéine chimère issue de la fusion C-terminale de la protéine GST (Glutathion S-transférase) à un pentadécapeptide RHILWTPANTPAMGY reproduisant la séquence consensus homologue au feuillet  $\beta$  B et la boucle BC de FNIII (voir exemple précédent et Figure 2b). Pour ce faire, les oligonucléotides présentés aux identificateurs de séquences 16 et 17 sont hybridés et introduits dans le site *Xhol* du plasmide pGEX-KG (Guan et Dixon, 1991, Anal. Biochem. 192, 262-267). Il est à noter que les oligonucléotides une fois réhybridés génèrent un site *Xhol* à l'extrémité 5' si l'insert est cloné dans l'orientation correcte. Ceci permet d'intégrer une seule copie ou de multiples copies en tandem au niveau du site *Xhol* reconstitué. La séquence du produit de fusion comprenant une copie du pentadécapeptide (désigné GST-FNx1) peut être schématisée de la manière suivante : GST- (site de clivage par la thrombine-PGIS-GGGGG-ILDSMGRLE-RHILWTPANTPAMGY(V)-ELKLNS-

stop. Les constructions GST-FNx2 et GST-FNx3 comportent respectivement 2 et 3 répétitions du pentadécapeptide entre les résidus LE et EL de la cassette de clonage.

Les oligonucléotides sens et antisens (SEQ ID NO: 18 et 19) codant pour la 5 séquence consensus obtenue par compétition avec le mAb 1D6.3 (Figure 2d) sont insérés selon la même stratégie que précédemment à l'extrémité C-terminale de la GST pour donner les constructions GST-MHCx1, GST-MHCx2 et GST-MHCx3 selon le nombre de motifs présents. Les protéines chimères GST-FN et GST-MHC sont produites dans *E. coli*, extraites et purifiées par affinité sur des billes 10 d'agarose-glutathion (Sigma) selon les méthodes conventionnelles (Smith et Johnson, 1988, *Gene* 67, 31-40).

En parallèle, les fibres complètes des sérotypes 2, 3 et 5 sont produites par voie recombinante selon la technologie baculovirus/cellules Sf9 déjà employée. La construction F2-FL582 portant le gène de la fibre Ad2 est décrite dans Novelli et 15 Boulanger (1991, *Virology* 185, 365-376). Les séquences codant pour les fibres Ad5 et Ad3 sont isolées par PCR en utilisant l'ADN viral à titre de matrice et des amorces sens et antisens appropriées telles que celles reportées aux SEQ ID NO: 20 et 13 et 21 et 15. Le segment amplifié est introduit dans un vecteur baculovirus sous le contrôle du promoteur polyhédrine et le produit d'expression 20 récupéré dans les surnageants de culture. On obtient F5-FL581 et F3-FL320 correspondant aux fibres Ad5 et Ad3 respectivement.

La capacité du module FNIII et du domaine  $\alpha$ -2 MHC-I recombinant à lier 25 la fibre adénovirale est évaluée par immunotransfert après incubation *in vitro* des protéines de fusion GST-FN et GST-MHC et des fibres recombinantes F2-FL582, F5-FL581 et F3-FL320. Les complexes formés sont isolés sur billes d'agarose glutathion dans les conditions décrites par Johnson et al. (1995, *J. Biol. Chem.* 270, 24352-24360) puis analysés sur gel de polyacrylamide de 12,5 % (SDS-PAGE) en utilisant un système de tampon discontinu (Laemmli, 1970, *Nature* 227, 680-685). Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (0,8 mA/cm<sup>2</sup> ; 30 système Cambridge Electrophoresis, UK) dans un tampon Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM, pH8,3 contenant 20 % de méthanol. Après traitement avec une

5 solution de blocage (lait écrémé 5 %, sérum de veau 1 % dans du tampon TBS-T : 20 mM Tris-HCl pH7,8, 0,15 M NaCl, 0,05 % Tween 20), la membrane est mise en contact avec l'anticorps 4D2.5 (Hong et Engler, 1991, *Virology 185*, 758-767) puis un conjugué anti IgG marqué à la peroxydase de rafort. La révélation par le substrat chimiluminescent peroxydase (SuperSignal, Pierce Chemicals) est réalisée selon Carrière et al. (1995, *J. Virol. 69*, 2366-2377) et les luminogrammes (Hyperfilm  $\beta$ -max, Amersham) sont analysés à 610 nm à l'aide d'un densitomètre automatique (REP-EDC, Helena Laboratories, Beaumont, TX). A titre indicatif, l'anticorps 4D2.5 reconnaît l'épitope FNPVYP du domaine de la queue conservé 10 chez la plupart des adénovirus mammifères.

15 GST-FNx1, GST-FNx2 et GST-FNx3 se lient à F5-AT386 et F2-AT388 avec une grande efficacité alors que F3-AT124 est retenu à un moindre niveau. Un comportement similaire est observé avec les protéines chimères GST-MHCx1, GST-MHCx2 et GST-MHCx3 qui retiennent F5-AT386 et F2-AT388 avec une efficacité supérieure à F3-AT124.

20 La fibre Ad5 se lie aux protéines de fusion GST-FN et GST-MHC et ceci avec une affinité 2 à 3 fois supérieure par rapport à la fibre Ad2 et 10 à 15 fois supérieure par rapport à la fibre Ad3. De plus, l'efficacité de liaison n'est pas dépendante du nombre de motifs présents dans la protéine de fusion, l'intensité étant comparable et même parfois plus faible entre GST-FNx1 et GST-FNx3 et GST-MHCx1 et GST-MHCx3. Ceci peut être expliqué par le fait que les motifs en tandem peuvent adopter une conformation qui nuit à la liaison.

25 EXEMPLE 5 : Influence des peptides synthétiques dérivés de FNIII et MHC-  
I $\alpha$ 2 sur l'attachement des virus à la surface cellulaire.

30 Deux peptides synthétiques reproduisant les motifs FNIII et MHC-I $\alpha$ 2 ont été synthétisés chimiquement et purifiés selon les techniques de l'art. FN20 (SEQ ID NO: 7) reproduit la séquence consensus des phagotopes élués par l'anticorps 7A2.7 et MH20 (SEQ ID NO: 6) correspond à celle des phagotopes élués par le mAb 1D6.3.

Les peptides FN20 et MH20 sont testés vis à vis de l'attachement de l'adénovirus rapporteur Ad5Luc3 à des cellules HeLa cultivées *in vitro*. Le test est réalisé en partie à 0°C, une température qui permet l'attachement des virus à la surface des cellules permissives mais, en revanche, bloque l'entrée des virus et le recyclage des récepteurs. L'Ad5Luc3 (MOI 0,16 pfu/10<sup>5</sup> cellules) est préalablement incubé avec des quantités croissantes de peptides (0,01 à 500 nM) à température ambiante pendant 2 heures puis le mélange est ajouté à une culture cellulaire placée sur glace. Après 1 h à 0°C, les virus non adsorbés et les peptides sont éliminés par lavage et la culture est poursuivie pendant 18 h à 37°C après ajout d'un milieu préchauffé. Les lysats cellulaires sont préparés de manière conventionnelle et l'activité luciférase exprimée en RLU (pour Relative Light Units en anglais) est déterminée (substrat Promega, Madison, WI ; luminomètre Lumat LB-9501, Brethold Bioanalytical, Wildbad, Allemagne).

Les résultats de compétition avec le peptide FN20 sont présentés à la Figure 15 3a. Aucun effet significatif n'est obtenu jusqu'à une molarité de 10 µM puis une augmentation progressive de l'activité luciférase apparaît au delà de 25 µM. En particulier, l'activité croît d'un facteur 100 entre 25 et 100 µM. Le peptide FN20 a donc un effet stimulateur de l'attachement viral. Il ne confère aucune cytotoxicité apparente et n'a pas d'effet négatif sur l'expression du gène luciférase une fois le 20 virus préattaché (peptide ajouté à la culture cellulaire après l'étape d'attachement viral à 0°C) ou préendocytosé (peptide ajouté à la culture cellulaire après l'étape d'attachement et de pénétration du virus).

Dans le cas du peptide MH20 (Figure 3b), on observe une légère augmentation de l'expression du gène luciférase pour les molarités comprises entre 25 0,05 et 2,5 µM (activité 5 à 6 fois plus élevée à 2,5 µM). Ce phénomène est suivi d'une diminution rapide des niveaux de luciférase lorsque les molarités utilisées sont supérieures à 5 µM, avec une diminution d'un facteur 100 par rapport au contrôle à 25 µM et de presque quatre ordres de magnitude à 50 µM, montrant que lié au virus, il bloque la fixation au récepteur cellulaire. Comme précédemment, 30 le peptide MH20 à des concentrations de 50 µM ne présente aucun effet cytotoxique et n'influence pas l'expression du gène reporter après le préattachement

ou la préendocytose de l'Ad5Luc3. L'inhibition presque totale de l'activité luciférase en présence de 50  $\mu$ M de MH20 est le reflet d'une neutralisation complète du virus.

5    EXAMPLE 6 : Séro-spécificité de la neutralisation virale par les peptides synthétiques.

Les adénovirus sauvages Ad5, Ad2 Ad3 sont préincubés pendant 2 h à température ambiante avec le peptide inhibiteur MH20 à une molarité constante 10 (25  $\mu$ M), la MOI variant de 0,2 à 2 pfu/cellule. Le mélange est mis en présence des cellules HeLa pendant 1 h à 0°C et la culture poursuivie à 37°C après élimination des virus non adsorbés dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. Le niveau de synthèse de l'hexon, de la protéine 100k, du penton base est de la fibre 15 est estimé par immunotitration (Wohlfart, 1988, J. Virol. 62, 2321-2328) sur les extraits cellulaires recueillis 48 h après l'infection.

L'infection des cellules HeLa par l'Ad5 ou l'Ad2 à une MOI de 0,2 à 2 pfu/cellule en présence de 25  $\mu$ M de MH20 pendant la phase d'attachement du virus, est suivie d'une inhibition de la synthèse des protéines de la capsid virale hexon, protéine 100 k, penton base et fibre 48 h après l'infection (facteur 15 à 30). 20 Par contre, lorsque l'infection est réalisée dans les mêmes conditions par l'Ad3 sauvage, la synthèse des protéines structurales n'est réduite que d'un facteur 1,5 à 2, ce qui suggère que la neutralisation adénovirale par MH20 est sérotype dépendante.

25    EXAMPLE 7 : Affinité de la fibre Ad5 pour les peptides FN20 et MH20.

5, 10 et 25  $\mu$ M de peptides synthétiques FN20 ou MH20 sont immobilisés sur la surface polystyrène d'une plaque de microtitration à 96 trous (Nunc, Maxisorb) 30 pendant une nuit à 4°C. Après lavage puis blocage avec une solution d'albumine sérique bovine (BSA) 3 % dans du tampon PBS, on fait réagir des concentrations croissantes de fibres F5-FL581 reprises dans du tampon PBS et marquées

- 25 -

radioactivement (marquage à la [<sup>35</sup>S] méthionine et la [<sup>35</sup>S] cystéine ; activité spécifique de 50000 à 65000 cpm/μg de protéine). La fibre adsorbée sur l'un ou l'autre des peptides est éluée avec une solution adéquate (urée 1M, NaOH 1M et SDS 1%) puis précipitée en présence d'acide trichloroacétique. La radioactivité contenue dans le précipité récupéré sur filtre GF/C est comptée à l'aide d'un spectromètre à scintillation liquide (Beckman LS-6500) et les constantes de dissociation (Kd) déterminées selon Scatchard (1949, Annls NY Acad. Sci. 51, 660-672).

Le Kd de la fibre Ad5 marquée à l'égard du peptide MH20 est évalué à  $3,0 \pm 0,6$  nM et celui trouvé pour le peptide FN20 est de  $8,0 \pm 1,9$  nM (n=3 dans les deux cas).

EXEMPLE 8 : L'infectivité de l'Ad5 est dépendante de l'expression des MHC-I à la surface des cellules permisives.

15

La lignée Daudi de lymphoblastoides B, établie à partir d'un lymphome de Burkitt, est naturellement déficiente en l'expression de la β-2 microglobuline et, de ce fait, ne possède pas à sa surface les molécules HLA de classe I (Daudi HLA-). La lignée cellulaire E8.1 dérivée des Daudi a été générée par transfection d'un gène codant pour la β-2 microglobuline afin de restaurer l'expression de molécules HLA de classe I à leur surface (Daudi-HLA+ ; Quillet et al., 1988, J. Immunol. 141, 17-20).

Les expériences d'attachement de l'Ad5Luc3 à 0°C ont été menées sur les cellules Daudi HLA- et Daudi-HLA+ avec une MOI de trois ordres de magnitude plus forte que celle employée dans le cas des cellules HeLa (0,3 à 150 pfu/10<sup>5</sup> cellules). L'activité luciférase mesurée dans les lysats cellulaires 18 h post-infection est représentée à la Figure 4. Lorsque l'infection concerne les cellules Daudi-HLA+, l'activité luciférase augmente régulièrement d'une manière MOI dépendante jusqu'à atteindre un plateau au delà de 5 pfu/10<sup>5</sup> cellules. Pour ce qui est des cellules Daudi HLA-, le signal luminescent est très faible (3 à 4 ordres de magnitude) par rapport à celui observé avec les cellules pourvues de molécules

- 26 -

HLA fonctionnelles à leur surface. Ces expériences montrent que l'expression du MHC-I à la surface cellulaire est nécessaire à l'infection Ad5.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATION GENERALE:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)
- (B) RUE: 3 rue Michel Ange
- (C) VILLE: Paris
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 75794 Cedex 16
- (G) TELEPHONE: (33) 01 44 96 40 00
- (H) TELECOPIE: (33) 01 44 96 50 00

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Récepteurs cellulaires des adénovirus.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 21

## (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 25 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: domaine alpha 2 des antigenes MHC-I (positions 156 a 180)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr  
1 5 10 15

- 28 -

Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln  
 20 25

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 26 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: homo sapiens
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: module de type III 1 de la fibronectine humaine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Asn Ser His Pro Ile Gln Trp Asn Ala Pro Gln Pro Ser His Ile Ser  
 1 5 10 15

Lys Tyr Ile Leu Arg Trp Arg Pro Lys Asn  
 20 25

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 25 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: homo sapiens
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: module de type III 4 de la fibronectine humaine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Val Lys Val Thr Ile Met Trp Thr Pro Pro Glu Ser Ala Val Thr Gly  
 1 5 10 15

- 29 -

Tyr Arg Val Asp Val Ile Pro Val Asn  
20 25

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 25 acides aminés
  - (B) TYPE: acide aminé
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (v) TYPE DU FRAGMENT: interne
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: homo sapiens
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: module de type III 5 de la fibronectine humaine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Ser Thr Val Leu Val Arg Trp Thr Pro Pro Arg Ala Gln Ile Thr Gly  
1 5 10 15

Tyr Arg Leu Thr Val Gly Leu Thr Arg  
20 25

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 25 acides aminés
  - (B) TYPE: acide aminé
  - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (v) TYPE DU FRAGMENT: interne
- (vi) ORIGINE:
  - (A) ORGANISME: homo sapiens
  - (C) INDIVIDUEL ISOLE: module de type III 14 de la fibronectine humaine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

- 30 -

Asn	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Trp	Gln	Pro	Pro	Arg	Ala	Arg	Ile	Thr	Gly
1															
							5						10		
															15

Tyr	Ile	Ile	Lys	Tyr	Glu	Lys	Pro	Ser
							20	
								25

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 20 acides aminés  
 (B) TYPE: acide aminé  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(vi) ORIGINE:  
 (A) ORGANISME: peptide de synthese MH20

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Arg	Ala	Ile	Val	Gly	Phe	Arg	Val	Gln	Trp	Leu	Arg	Arg	Tyr	Phe	Val
1															
								5					10		
															15

Asn	Gly	Ser	Arg
		20	

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 20 acides aminés  
 (B) TYPE: acide aminé  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(vi) ORIGINE:  
 (A) ORGANISME: peptide de synthese FN20

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

Arg	His	Ile	Leu	Trp	Thr	Pro	Ala	Asn	Thr	Pro	Ala	Met	Gly	Tyr	Leu
1															
								5					10		
															15

Ala	Arg	Val	Ser
		20	

- 31 -

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: serotype 5

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Leu	Ala	Pro	Ile	Ser	Gly	Thr	Val	Gln	Ser	Ala	His	Leu	Ile	Ile	Arg
1					5					10				15	

Phe Asp

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 16 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: serotype 2

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

Thr	Val	Ala	Ser	Val	Ser	Ile	Phe	Leu	Arg	Phe	Asp	Gln	Asn	Gly	Val
1					5				10				15		

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 32 -

(A) LONGUEUR: 14 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Mastadenovirus  
(C) INDIVIDUEL ISOLE: serotype 5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe Arg Asn Gly Asp Leu Thr  
1 5 10

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 13 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(v) TYPE DU FRAGMENT: interne

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Mastadenovirus  
(B) SOUCHE: serotype 2

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

Asn Ser Ser Leu Lys Lys His Tyr Trp Asn Phe Arg Asn  
1 5 10

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 42 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- 33 -

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: serotype 5
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese (nt32164 32205 Ad5)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CCTAAACTAG GATCCGGCCT TAGTTTGAC AGCATGGGTG CC

42

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 37 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: serotype 5
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese (nt 32919 32883 Ad5)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

CTGTGAGTTT GATTAAGGTA CCGTGATCTG TATAAGC

37

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- 34 -

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Mastadenovirus

(B) SOUCHE: serotype 3

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese (Ad3)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

GGTCTTACAT TTGACTCTTC CATGGCTATT GCACTG

36

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 35 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Mastadenovirus

(B) SOUCHE: serotype 3

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese (Ad3)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

CAATAAAAAA TGTGGTACCT TATTTTGTT GTCAG

35

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 51 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- 35 -

(A) ORGANISME: homo sapiens  
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese  
 (sequence consensus FNIII)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

TCGAGAGGCA TATACTTTGG ACTCCTGCTA ATACACCGGC AATGGGGTAT C

51

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 51 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: homo sapiens
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese  
 (sequence consensus FNIII)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

TCGACATACC CCATTGCCGG TGTATTAGCA GGAGTCCAAA GTATATGCCT C

51

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 65 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: homo sapiens
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese codant  
 pour la séquence consensus MHC-I

- 36 -

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

TCGAGAGGGC TATAGTTGGG TTTAGGGTGC AATGGCTTAG GCGGTATTTT GTGAATGGGT	60
CGAGG	65

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 65 paires de bases  
 (B) TYPE: acide nucléique  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:  
 (A) ORGANISME: homo sapiens  
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese codant pour aa 157-176 du MHC-I

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

TCGACCTCGA CCCATTACAA AAATACCGCC TAAGCCATTG CACCTAAAC CCAACTATAG	60
CCCTC	65

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 30 paires de bases  
 (B) TYPE: acide nucléique  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:  
 (A) ORGANISME: Mastadenovirus  
 (B) SOUCHE: serotype 5  
 (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese (nt 31021-31050 Ad5)

- 37 -

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

CCATCCGCAC CCACTATGAT CACGTTGTTG

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Mastadenovirus
- (B) SOUCHE: serotype 3
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese (Ad3)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

CTTCATTTCT TTATCCCCCC ATGGCCA

27

Revendications

1. Utilisation d'un ligand bifonctionnel pour le ciblage d'un adénovirus vers une protéine de surface cellulaire autre que le récepteur cellulaire naturel dudit adénovirus, ledit ligand bifonctionnel comportant une première partie ligand capable d'interagir avec la fibre dudit adénovirus, une deuxième partie ligand capable d'interagir avec ladite protéine de surface cellulaire et, éventuellement, un espaceur entre lesdites première et deuxième parties ligands.
2. Utilisation selon la revendication 1, selon laquelle ladite première partie ligand comprend une séquence en acides aminés homologue ou identique à au moins 6 acides aminés continus compris dans la SEQ ID NO: 6.
3. Utilisation selon la revendication 2, selon laquelle ladite première partie ligand est un peptide ayant une séquence en acides aminés identique à la SEQ ID NO: 6 commençant avec le résidu arginine en position 1 et finissant avec le résidu arginine en position 20.

275822

1/4

fibre : 438<sub>V</sub> L A V K G S L A P I S G T V Q S A H L I I R F D E N G<sup>465</sup>  
(D)

1D6.3

V F - V K -- L - P

P - D V A P - S

L I P F N S

L S - N - Q S G

S G V G Q A

S V G D - Y G

G - I - S - H T G

G - I - S - H T G'

G - A - S - H T V

H F Q Y R M

R R I F R - D

fibre : 470<sub>N S F L D P E Y W N F R N G D L T</sub><sup>486</sup>  
(E) (F)

7A2.7

M Q P V Y F

L G P - V - N S

A L - P - - H I V

A - P - - H E L R

M N V G A H

V T S T Y H

L Q K V H -- R

D L W S V L

F W L A V R

W A L F R S

Y L G F F K

I A R -- L I S

R N Y T L T

R D A V M I

S R P T M L

FIG. 1

2/4

(a) mAb 7A2.7

FIG. 2

R H R M L Q  
 R R H - - W - P F  
 W - Y E - W - I G  
 W - V - I W S I  
 I - L W T - P G  
 L Q - Y S L P  
 L - L D - F - - P A  
 L T - P - N T I  
 L G - K A - L P  
 S P H G S G  
 A P M - V A L  
 T A A M - Y R  
 L F I A - R L  
 Y L Y G R V  
 A R V S R S

(b) Séquence consensus générée par compétition avec 7A2.7

R H - I - L W T - P A N T P A M G Y L A - R V S

Modules III de la fibronectine

FNIII<sub>1</sub>: N S H P I Q - W N A P Q P S H I S K Y I L - R W R P K N  
 FNIII<sub>4</sub>: V K V T I - M W T P P E S A - V T G Y R V - D V I P V N  
 FNIII<sub>5</sub>: S T V L V R - W T P P R A Q - I T G Y R L - T V G L T R  
 FNIII<sub>14</sub> N S L L V S - W Q P P R A R - I T G Y I I - K Y E K P S

(c) mAb 1D6.3

A R A - I V G

F V - W G L S  
 F R V Q W - L  
 Q V - H - L F R  
 V Q W - F K P  
 W - I - F L M - Q  
 R R Y F V - N  
 Y F G S N S  
 A Y G V M P  
 L A P L G - K  
 S R - L K M - G  
 H M E L L M  
 H S - - N G S R  
 T R - V R - T S  
 R - S E E T I

(d) Séquence consensus générée par compétition avec 1D6.3

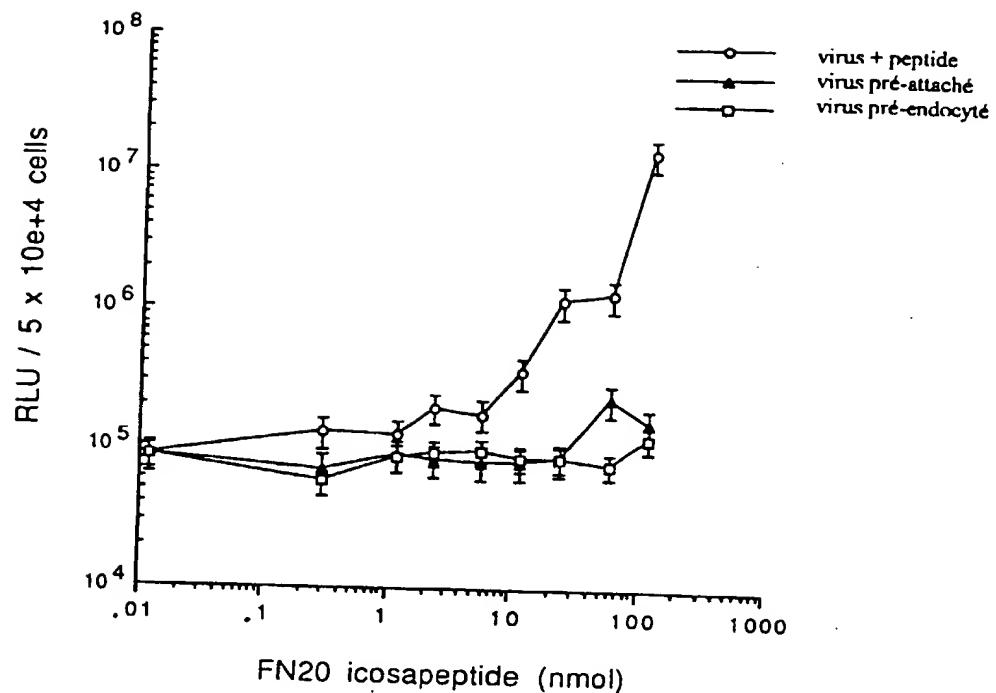
A R A - I V G F R V Q W - L R R Y F V - N G S R E T I

domaine  $\alpha 2$  HLA (consensus):156<sup>180</sup> L R A Y L E G T C V E W - L R R Y L E - N G - K E T L Q

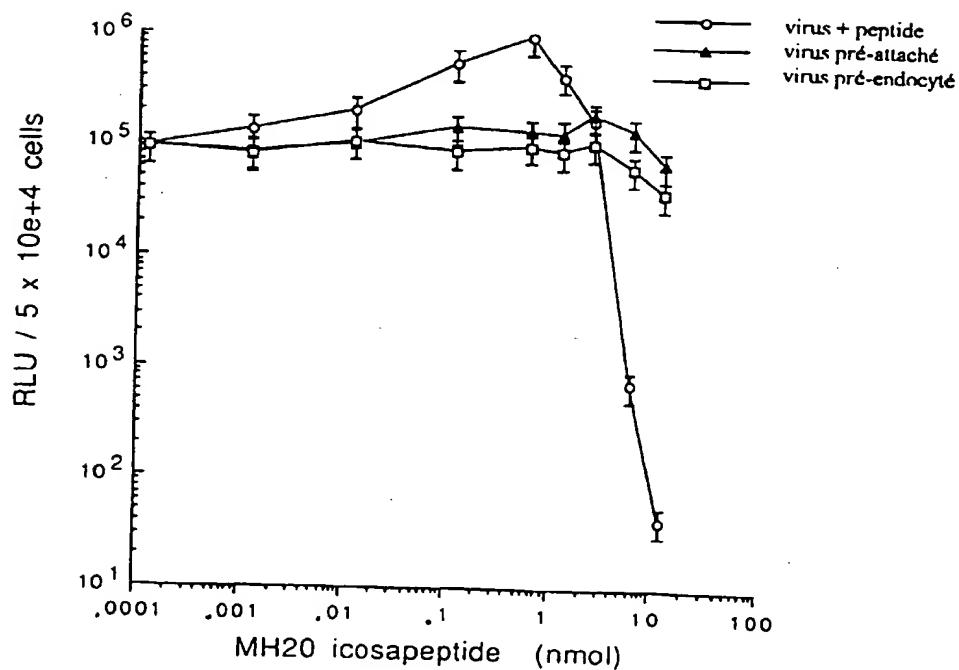
3/4

(a)

FIG. 3



(b)



4/4

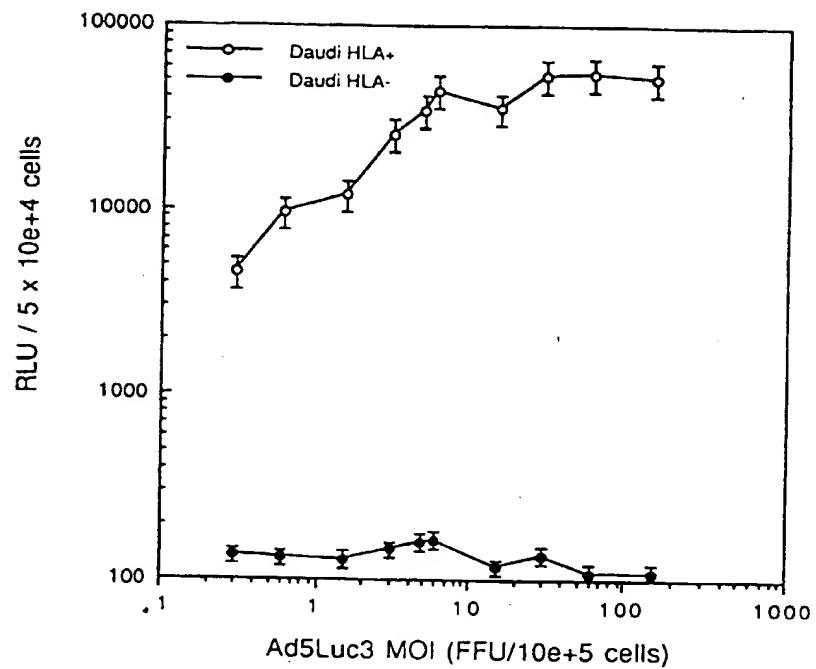


FIG. 4